

DIALOG(R)File 351:Derwent WPI  
(c) 2006 Thomson Derwent. All rts. reserv.

011881588

WPI Acc No: 1998-298498/199827

**Method of preparing cyclosporin**

Patent Assignee: SANDOZ AG (SANO ); NOVARTIS AG (NOVS ); SANDOZ LTD (SANO )

Inventor: BOELSTERLI J J; BOLLINGER P; PAYNE T G

Number of Countries: 004 Number of Patents: 006

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
BR 9603738	A	19980526	BR 963738	A	19960912	199827 B
RU 2170741	C2	20010720	RU 96116816	A	19960816	200152
MX 9603672	A1	19980201	MX 963672	A	19960827	199954 N
MX 193923	B	19991104	MX 963672	A	19960827	200106 N
CN 1176966	A	19980325	CN 96122493	A	19960913	200212 N
CN 1130373	C	20031210	CN 96122493	A	19960913	200565 N

Priority Applications (No Type Date): BR 963738 A 19960912; MX 963672 A 19960827; RU 96116816 A 19960816; CN 96122493 A 19960913

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
BR 9603738	A			C12P-001/02	
RU 2170741	C2			C07K-007/64	
MX 9603672	A1			C12P-017/18	
MX 193923	B			C07K-007/064	
CN 1176966	A			C07K-007/06	
CN 1130373	C			C07K-007/06	

Abstract (Basic): RU 2170741 C2

NOVELTY - Described is method of preparing cyclosporin.

DETAILED DESCRIPTION - Described is method of preparing cyclosporin of formula II:

A-B-X-MeLeu-Y-MeLeu-Ala-(D)Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal (II)

where

A= is residue of 3'-dexoxy-3'-oxo-HeBmt;

B= is alpha Abu-, Thr-, -Val- or Nva;

X= is Sar- or residue of optically active alpha-N- methylated alpha-amino acid in D-configuration;

Y= is Val- or when B is Nva.

The method comprises selective oxidation of intermediate cyclosporin of formula II where A is MeBmt, dimethyl sulfoxide in combination with N,N'-dicyclohexyl carbodiimide or dodecylmethyl sulfoxide in combination with N,N'-dicyclohexyl carbodiimide.

USE - Biochemistry.

ADVANTAGE - Simplified process, more ecological process and increased yield of the desired product.

pp; 0 DwgNo 0/0

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): C07K-007/06; C07K-007/064; C07K-007/64; C12P-001/02; C12P-017/18

International Patent Class (Additional): A61K-031/71; A61K-038/13; A61P-037/00; C07K-001/107; C12P-021/004; C12P-021/04





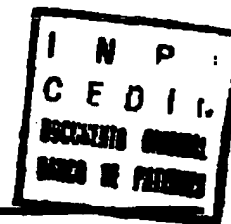
REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL  
Ministério da Indústria, do Comércio e do Turismo  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) (21) **PI 9603738-5 A**

(51) Int. Cl.:  
C12P 1/02  
A61K 31/71

(22) Data de Depósito: 12/09/1998

(43) Data de Publicação: 26/05/98 (RPI 1431)



(54) Título: **PROCESSO DE PRODUÇÃO**

(71) Depositante(s): Sandoz A.G. (CH)

(72) Inventor(es): Johann Jakob Boelsterli, Pietro Bollinger, Trevor Glyn Payne

(74) Procurador: Dannemann, Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

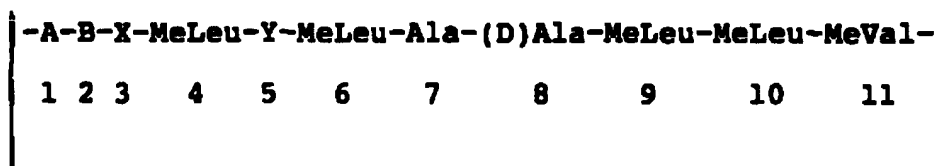
(57) Resumo: Patente de invenção: "PROCESSO DE PRODUÇÃO". Processo para a produção de uma [3-desidrod3'-oxo-MeBmt] 1ciclosporina, em particular da fórmula em que A é um resíduo 3'-desidrod-3'-oxo- MeBmt., B é -Ser- ou resíduo de um resíduo de aminoácido alfa-N-metil do, opcionalmente ativo, tendo a configuração (D), e Y é -Val- ou, adicionalmente, quando B é Nva, Nva compreendendo cultivar um organismo para produzir uma ciclosporina intermediária da fórmula II, em que A é MeBmt.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção  
para "PROCESSO DE PRODUÇÃO".

Esta invenção refere-se a um processo para a produção de uma [3'-desoxi-3'-oxo-MeBmt]<sup>1</sup> ciclosporina, em particular a um processo para a produção de [3'-desoxi-3'-oxo-MeBmt]<sup>1</sup>-[Nva]<sup>2</sup>-ciclosporina ou [3'-desóxi-3'oxo-MeBmt]<sup>1</sup>-[Val]<sup>2</sup>-ciclosporina.

5 De acordo com a presente invenção, é provido um processo para a produção de uma [3'-desóxi-3'-oxo-MeBmt]<sup>2</sup>-ciclosporina da fórmula II

II



em que

A é um resíduo 3'-desóxi-3'-oxo-MeBmt;

10 B é um -alfaAbu-, -Thr-, -Val- ou -Nva-;

X é -Sar- ou o resíduo de um resíduo de alfa-aminoácido alfa-N- metilado, opcionalmente ativo, tendo a configuração (D), e

Y é -Val- ou, adicionalmente, quando B é Nva,  
15 Nva, compreendendo cultivar um organismo para produzir uma

ciclosporina intermediária da fórmula II, em que A é MeBmt; recuperar a ciclosporina intermediária e oxidar seletivamente a ciclosporina intermediária, para produzir uma ciclosporina de fórmula II, em que A é um resíduo  
5 3'-desóxi-3'-oxo-MeBmt.

Compostos da fórmula II, em que A é um resíduo de 3'-desóxi-3'-oxo-MeBmt, são úteis para aumentar a sensibilidade ou para aumentar a eficiência de terapia com medicamento quimioterapêutico e, em particular, são úteis  
10 para inverter a resistência de tipos variados (p.ex. adquiridos ou inatos), ou para aumentar ou restaurar a sensibilidade de terapia com medicamento administrado. Formas de terapia com medicamento quimioterapêutico à qual estes compostos podem ser aplicados incluem, por exemplo,  
15 quimioterapia antiparasítica, p.ex. antivirótica, antibacteriana ou antiprotozoária e, em particular, quimioterapia antineoplástica ou citostática.

Ciclosporinas particularmente preferidas, que podem ser produzidas utilizando-se o processo da invenção, são [3'-desóxi-3'-oxo-MeBmt]<sup>1</sup>-[Nva]<sup>2</sup>-ciclosporina ou especialmente [3'-desóxi-3'-oxo-MeBmt]<sup>1</sup>-[Val]<sup>2</sup>-ciclosporina.  
20 Estes compostos são preparados, oxidando-se [Nva]<sup>2</sup>-ciclosporina e [Val]<sup>2</sup>-ciclosporina, e estes processos de oxidação per se são incluídos no escopo da invenção.

Consequentemente, em um aspecto adicional da invenção, é provido um processo para a produção de [3'-desóxi-3'-oxo-MeBmt]<sup>1</sup>-[B']<sup>2</sup>-ciclos porina em que B' é

Nva ou Val compreendendo oxidar [B']<sup>2</sup>-ciclosporina. [Val]<sup>2</sup>-ciclosporina é conhecida também como ciclosporina D.

A [B']<sup>2</sup>-ciclosporina para uso no processo de oxidação pode ser obtida por cultivo de um organismo que produz [B']<sup>2</sup>-ciclosporina ou pode ser produzida por síntese parcial ou completa, inclusive derivatização de uma ciclosporina diferente ou produto de fermentação  
5 correlato.

Qualquer agente de oxidação, solvente, catalisador ou condições de reação ou esquema adequado pode ser utilizado na etapa de oxidação do processo da invenção ou o processo do aspecto adicional. Reagentes  
10 apropriados para a reação de oxidação incluem sulfeto de dimetila em combinação com N-cloro-succinimida ou, preferivelmente, sulfóxido de dimetila em combinação com N,N'-diciclohexilcarbodiimida, preferivelmente em um solvente orgânico não-polar tal como tolueno. Mais  
15 preferivelmente, porém, sulfóxido de dodecil metila em combinação com N,N'-diciclohexilcarbodiimida é utilizado como agente de oxidação em um solvente tal como tolueno. Sulfóxido de dodecil metila é preferido tanto a sulfeto de dimetila e quanto a sulfóxido de dimetila, uma vez que  
20 sulfeto de dimetila é indesejável por razões de segurança e ecológicas, e sulfóxido de dimetila dá lugar à produção de sulfeto de dimetila como subproduto da reação. Também há menos problemas de odor indesejável associados ao uso de sulfóxido de dodecil metila. Preferivelmente, a reação

de oxidação é realizada a baixa temperatura, p.ex. de -15  
a +20°C.

A invenção é descrita, a título de ilustração  
apenas, com base no seguinte exemplo, que descreve a  
5 preparação de

[3'-desóxi-3'-oxo-MeBmt]<sup>1</sup>-[Val]<sup>2</sup>-ciclosporina.

Exemplo

a- Preparação de Ciclosporina D

A ciclosporina D (também conhecida como  
[Val]<sup>2</sup>-ciclosporina) é preparada por fermentação de um or-  
ganismo adequado, tal como tolypocladium inflatum GAMS  
10 (depositado com o US Northern Regional Research  
Laboratories Culture Collection, como depósito No. NRRL  
8044), recuperado do caldo de fermentação e,  
subsequentemente, purificado como descrito abaixo.

500 1 de uma solução de nutriente contendo por  
15 1, 40 g de glicose, 2 g de caseinato de sódio, 2,5 g de  
fosfato de amônio, 5 g de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 2 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3 g of  
NaNO<sub>3</sub>, 0,5 g of KCl, 0,01 g de FeSO<sub>4</sub> e água  
desmineralizada a 1 l, são inoculados com 50 l de uma pré-  
cultura da cepa NRRL 8044 e são incubados em um fermen-  
20 tador de aço sob agitação (170 rpm) e aeração (1 l  
ar/minuto/1 solução de nutriente) por 13 dias a 27°C (vide  
Pedido de Patente alemão publicado nº 2.455.859).

O licor de cultura é agitado com a mesma  
quantidade de n-butyl acetato, concentrado por evaporação  
25 em um vácuo, após separação da fase orgânica, e o extrato  
cru é desengordurado por uma separação de 3 fases entre

metanol/água (9:1) e éter de petróleo. A fase metanólica é separada, concentrada por evaporação em um vácuo e o produto cru é precipitado pela adição de água. O material obtido quando da filtração é cromatografado sobre sílica gel com hexano/acetona (2:1) como eluente. As frações inicialmente eluídas contêm predominantemente ciclosporina A e ciclosporina D, e as frações eluídas posteriormente contêm predominantemente ciclosporina C. Para maior purificação, as frações contendo ciclosporina A e D são cristalizadas a partir de duas vezes a duas e meia vezes a quantidade de acetona a  $-15^{\circ}$ . O cristalato é novamente cromatografado duas vezes sobre sílica gel, as frações inicialmente eluídas com etil acetato saturado com água, contendo ciclosporina D em forma grandemente enriquecida. Estas são dissolvidas em duas vezes a quantidade de acetona e são deixadas cristalizar a  $-15^{\circ}$  C. O produto cristalino cru resultante da ciclosporina D é dissolvido para maior purificação em uma quantidade 10 vezes maior de acetona, 2% em peso de carvão ativo são adicionados, e se efetua um aquecimento por 5 minutos a  $60^{\circ}$ C. O filtrado claro quase incolor, obtido quando da filtração sobre talco é concentrado por evaporação a um terço de seu volume e é deixado esfriar à temperatura ambiente, após o que a ciclosporina D cristaliza-se espontaneamente. A cristalização é completada deixando-a parada a  $-17^{\circ}$  C. Os cristais obtidos por filtração são lavados com uma pequena quantidade de acetona gelada e são secados subsequentemente em um vácuo elevado a  $80^{\circ}$  C por 2 horas.



# CARACTERIZAÇÃO DE ciclosporina D

Cristais prismáticos, incolores P.F. 148-151° C.

(alfa)<sub>D</sub><sup>20</sup> = -245° (c=0,52 em clorofórmio)

(alfa)<sub>D</sub><sup>20</sup> = -211° (c=0,51 em metanol)

## 5 b- Preparação de Sulfóxido de Dodecil metila

478 g (2,2 moles) de sulfeto de dodecil metila, 52,5 g de ácido acético glacial e 1 l de etanol anidro são combinados e aquecidos a 70° C com agitação. Dentro de 90 min. uma solução de 215 g (2,2 moles) de peróxido de hidrogênio em 540 ml de água são adicionados com agitação, e a agitação é continuada por cerca de 1 hora e até que a reação esteja completada em pelo menos 90%, conforme determinado por análise cromatográfica de gás. A mistura é esfriada então a 20-25° C, e uma solução de 27 g de metabissulfeto de sódio em 41 ml de água é adicionada, e a mistura resultante é agitada por 20 min, enquanto se mantém a temperatura a 20-25° C. 3 l de tolueno e uma solução de 93 g de bicarbonato de sódio em 1,07 l de água são adicionados então, a mistura é agitada e deixa-se as fases se separarem. A fase aquosa é então descarregada, a fase orgânica lavada com 1 l de água, a água de lavagem descarregada e a fase orgânica concentrada sob pressão reduzida a um volume de cerca de 1,25 l. O concentrado é aquecido a 50-55° C e 1,5 l de hexano é adicionado. A solução resultante é salpicada com cristais de sulfóxido de dodecil metila e resfriada por um período de cerca de 1 hora a 20-25° C. e depois agitada a esta temperatura. A solução é esfriada então a 0-5°C, dentro de um período de

cerca de 30 min., agitada a esta temperatura por cerca de 3 horas e o precipitado sólido é coletado por centrifugação. O sólido é lavado então com 400 ml de hexano frio (0° C) e secado a uma temperatura não superior a 60° C sob pressão reduzida para produzir 462 g de sulfóxido de dodecil metila (cerca de 90% de produção teórica).

c- Oxidação de Ciclosporina D em  
[3'-desoxi-3'-oxo-MeBmt]<sup>1</sup>-[Val]<sup>2</sup>-ciclosporina

269 g (0,22 moles) de ciclosporina D pura são dissolvidos em 2,95 l de tolueno, 283 g (1,22 moles) de sulfóxido de dodecil metila, preparado como descrito acima, são adicionados, a mistura é esfriada a 0-5° C e 78 g de ácido dicloroacético são adicionados juntamente com mais 50 ml de tolueno. A temperatura da mistura de reação é mantida a 0-5° C por cerca de 45 min, após o que uma solução de 205 g (0,99 moles) de N,N'-diciclohexilcarbodiimida em 290 ml de tolueno é adicionada. A mistura de reação é agitada por cerca de 30 min. e até que a reação esteja completada em pelo menos 95%, como determinado por cromatografia HPLC. Uma solução de 81 g (0,64 moles) de ácido oxálico em 630 ml de água é adicionada e a mistura resultante é agitada a 0-5° C por cerca de 3 horas. Os sólidos formados são separados por centrifugação e lavados com 440 ml de tolueno frio (5° C) e os sólidos são descarregados então. A fração líquida da mistura de reação e os líquidos de lavagem são combinados então, as fases são deixadas separar-se, a fase aquosa é

descarregada e uma solução aquosa de bicarbonato de sódio (80 g em 1,25 l) é adicionada à fase orgânica, até que o pH atinja 7-8. Após a agitação, as fases são deixadas separar-se, a fase aquosa é descarregada e a fase orgânica é lavada com 650 ml de água. A água de lavagem é descarregada e a fase orgânica é evaporada até a secura sob pressão reduzida a uma temperatura não superior a 60° C. O resíduo é dissolvido em uma mistura de 560 ml de acetato de isopropila e 10 ml de água com aquecimento a 55-60° C. Dentro de cerca de 30 min. a solução é esfriada a cerca de 40° C e salpicada com cristais de sulfóxido de dodecil metila. Por um período de cerca de 90 min a mistura é esfriada a -10 a - 15° C e agitada a esta temperatura por cerca de 4 horas. Os sólidos são removidos por centrifugação, lavados com 390 ml de acetato de isopropila e depois descarregados. A fração líquida da mistura de reação e os líquidos de lavagem são combinados então para dar uma solução de 1,28 kg contendo cerca de 256 g de [3'-desóxi-3-oxo-MeBmt]<sup>1</sup>-[Val]<sup>2</sup>-ciclosporina (cerca de 95% de produção teórica).

A solução obtida como descrito acima é enriquecida utilizando-se cromatografia de sílica gel. Duas colunas são preparadas, cada uma contendo 1 kg de sílica gel suspensa em 2,5 l de acetato de isopropila e cada uma carregada com 162 g de solução. As colunas são eluídas a uma taxa de fluxo de 500 ml/hora com acetato de isopropila saturado com água e frações coletadas na faixa dos primeiros 4 l (primeiro eluído), os 500 l seguintes (se-

gundo eluído), os 4,5 l seguintes (terceiro eluído) e o 1  
1 seguinte (quarto eluído). Como determinado por HPLC, o  
produto desejado está no terceiro eluído. Assim, os  
primeiros eluídos são descarregados e o segundo e o quarto  
5 eluído são retidos para processamento. Os terceiros  
eluídos procedentes de ambas as colunas são combinados,  
concentrados sob pressão reduzida a um volume de cerca de  
320 ml e depois evaporados até a secura sob pressão  
reduzida a uma temperatura não superior a 60° C para dar  
10 aproximadamente 40 g de produto.

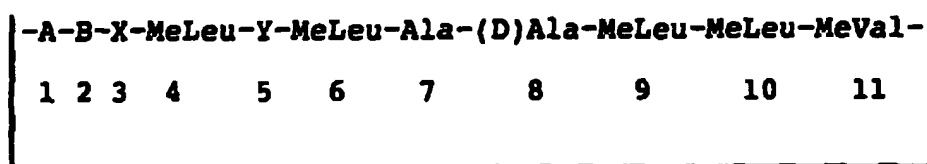
Este produto é mais purificado por cristalização  
a partir de tert-butil metil éter. Verificase que o  
produto de [3'-desoxi-3'-oxo-MeBmt]'-[Val]<sup>2</sup>-ciclosporina  
resultante tem um ponto de fusão na faixa de 195-198° C,  
uma rotação ótica (alfa)<sub>D</sub><sup>20</sup> = -255,1° (c=0,5 em CHCl<sub>3</sub>) e um  
15 peso molecular de 1214,65.

[3'-desoxi-3'-oxo-MeBmt]'-[Nva]<sub>2</sub>-ciclosporina  
pode ser preparado analogamente por oxidação de  
[Nva]<sup>2</sup>-ciclosporina, substancialmente como descrito acima  
para a ocidação de [Val]<sup>2</sup>-ciclosporina.

## REIVINDICAÇÕES

1- Processo para a produção de uma ciclosporina da fórmula II

### II



5 em que

A é um resíduo 3'-desoxi-3'-oxo-MeBmt;

B é um -alfaAbu-, -Thr-, -Val- ou -Nva-;

X é -Sar- ou o resíduo de um resíduo de alfa-aminoácido alfa-N- metilado, opcionalmente ativo, tendo a  
10 configuração (D), e

Y é -Val- ou, adicionalmente, quando B é Nva, Nva, compreendendo cultivar um organismo para produzir uma ciclosporina intermediária da fórmula II, em que A é MeBmt; recuperar a ciclosporina intermediária e oxidar  
15 seletivamente a ciclosporina intermediária, para produzir uma ciclosporina de fórmula II, em que A é um resíduo 3'-desóxi-3'-oxo-MeBmt.

2- Processo de acordo com a reivindicação 1, para a produção de [3'-desóxi-3'-oxo-MeBmt]<sup>1</sup>-[Nva]<sup>2</sup>-ciclosporina ou

[3'-desóxi-3'-oxo-MeBmt]<sup>1</sup>-[Val]<sup>2</sup>-ciclosporina.

3- Processo para a produção de [3'-desóxi-3'-oxo-MeBmt]<sup>1</sup>-[B']<sup>2</sup>-ciclosporina, em que B' é Nva ou Val, compreendendo a oxidação de uma (B')<sup>2</sup>-ciclosporina.

4- Processo de acordo com a reivindicação 1, em que sulfeto de dimetila em combinação com N-clorosuccinimida é utilizado como reagente oxidante.

5- Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, em que sulfóxido de dimetila em combinação com N,N'-diciclohexilcarbodimida ou sulfóxido de dodecil metila em combinação com N,N'-diciclohexilcarbodiimida é utilizado como o agente de oxidação.

6- Processo de acordo com a reivindicação 4 ou 5, em que o processo é realizado a uma temperatura entre -15° a +20° em um solvente orgânico não-polar tal como tolueno.

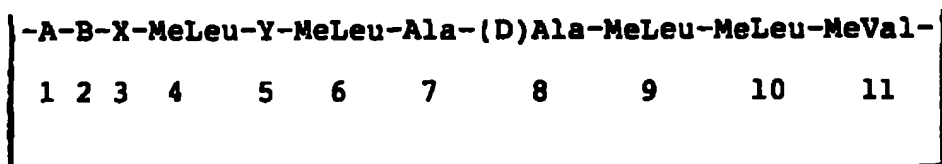
## RESUMO

Patente de Invenção: "PROCESSO DE PRODUÇÃO."

Processo para a produção de uma [3'-desóxi-3'-oxo-MeBmt]<sup>1</sup> ciclosporina, em particular da fórmula

5

II



em que

A é um resíduo 3'-desóxi-3'-oto-MeBmt.,

B é -Sar- ou o resíduo de um resíduo de alfa-aminoácido alfa-N-metila do, opcionalmente ativo, tendo a  
10 configuração (D), e

Y é -Val- ou, adicionalmente, quando B é Nva, Nva compreendendo cultivar um organismo para produzir uma ciclosporina intermediária da fórmula II, em que A é MeBmt.

*This Page Blank (uspto)*